

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua jenis yaitu bahan untuk pembuatan kecap ikan kuniran dan bahan untuk menguji kecap ikan sesuai dengan parameter yang diinginkan. Bahan yang digunakan dalam pembuatan kecap ikan adalah ikan kuniran 5 kg, enzim papain dengan konsentrasi 5%, 8%, dan 11%, serta garam dengan konsentrasi 5%. Bahan yang digunakan dalam pengujian kimia adalah asam sulfit, petroleum ether, buffer asam asetat pH 7, biuret, kertas saring, bovin serum albumin, tisu dan enzim papain komersial merk "Paya".

3.1.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pembuatan kecap antara lain ikan kuniran, pisau, blender, baskom, sendok, kain blacu, timbangan digital, *autoclave*, *centrifuge*

Alat yang digunakan dalam analisa mutu kecap ikan adalah pisau, timbangan digital, gelas ukur 100 ml, *beaker glass* 100ml, pipet volume 10 ml, bola hisap, *beaker glass* 50 ml, *washing bottle*, spatula, sendok bahan, cuvet, *centrifuge*, alat destilasi, alat ekstraksi goldfisch, oven vakum, desikator, cawan porselen, tanur pengabuan, kertas saring whatman, spektrofotometer, dan laptop

3.2 Metode Penelitian

3.2.3 Metode

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

Perlakuan yang akan digunakan pada penelitian pendahuluan adalah lama fermentasi dan konsentrasi enzim papain terhadap kualitas kecap ikan kuniran. Sedangkan penelitian utama dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim papain, pengaruh lama fermentasi serta pengaruh interaksi antara keduanya terhadap kualitas kecap ikan kuniran juga untuk mendapatkan konsentrasi enzim papain dan lama fermentasi yang optimal untuk mendapatkan kualitas kecap ikan terbaik.

3.2.4 Variabel

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi enzim papain dan lama fermentasi. Sedangkan variabel terikat penelitian ini adalah kadar protein, kadar abu, kadar air, kadar lemak, rendemen, organoleptik, derajat keasaman (pH) dan total asam amino

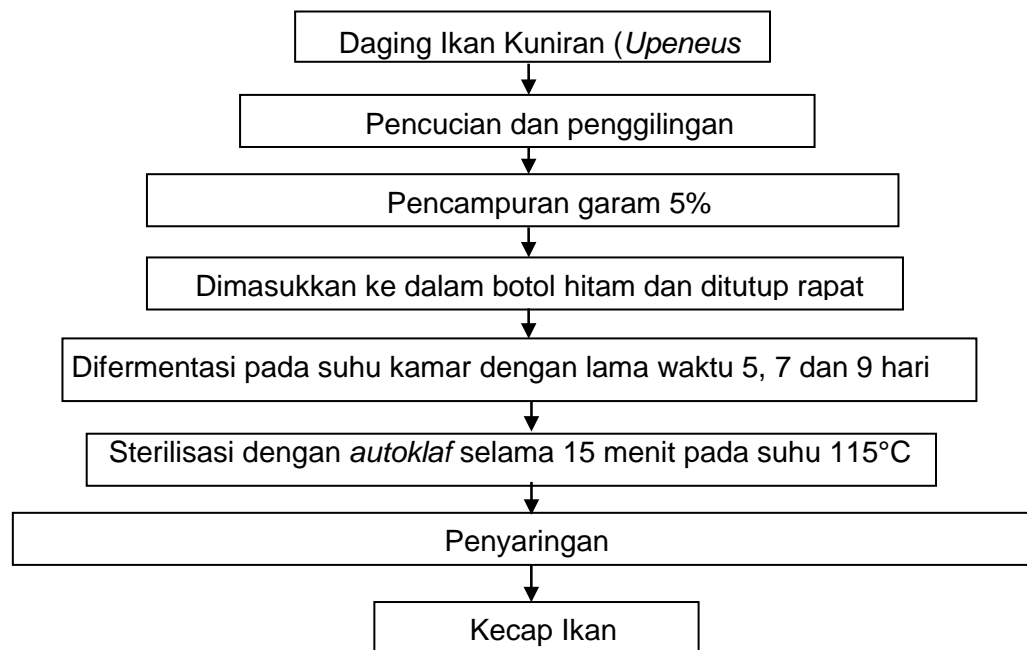
3.3 Penelitian Pendahuluan

Sebelum melakukan penelitian utama, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan. Penelitian pendahuluan dilakukan dalam dua tahap penelitian. Pada Penelitian pendahuluan tahap pertama bertujuan untuk memperoleh lama fermentasi yang optimum dengan menggunakan kadar protein terlarut sebagai parameternya. Sedangkan pada penelitian pendahuluan tahap kedua bertujuan untuk memperoleh konsentrasi enzim papain yang optimum dengan menggunakan kadar protein terlarut sebagai parameternya.

3.3.1 Penelitian Pendahuluan Tahap 1

Penelitian pendahuluan tahap satu bertujuan untuk memperoleh lama fermentasi yang optimum dengan menggunakan protein sebagai parameternya. Penelitian pendahuluan tahap dua akan menjadi acuan untuk penelitian pendahuluan tahap tiga. Menurut penelitian Kurniawan (2008) bahwa kadar protein tertinggi pada

kecap ikan lele didapatkan pada lama fermentasi 7 hari dan konsentrasi garam 5% sebesar 17.95%. Oleh karena itu, lama fermentasi dan konsentrasi garam tersebut dijadikan acuan untuk penelitian pendahuluan tahap dua dengan *range* lama fermentasi yaitu 5, 7 dan 9 hari. Prosedur penelitian pendahuluan tahap satu dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 1. Alur Proses Penelitian Pendahuluan Tahap 1

Pada penelitian pendahuluan tahap satu didapatkan kecap ikan dengan kadar protein terlarut tertinggi terdapat pada lama fermentasi 9 hari dengan nilai 2.74 ± 0.11 . Sedangkan kadar protein terlarut terendah terdapat pada lama fermentasi 5 hari dengan nilai 2.25 ± 0.11 . Artinya semakin lama proses fermentasi maka semakin tinggi pula nilai kadar protein yang dihasilkan.

Adapun rata – rata kadar protein kecap ikan penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 7. Dan hasil analisis statistik penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

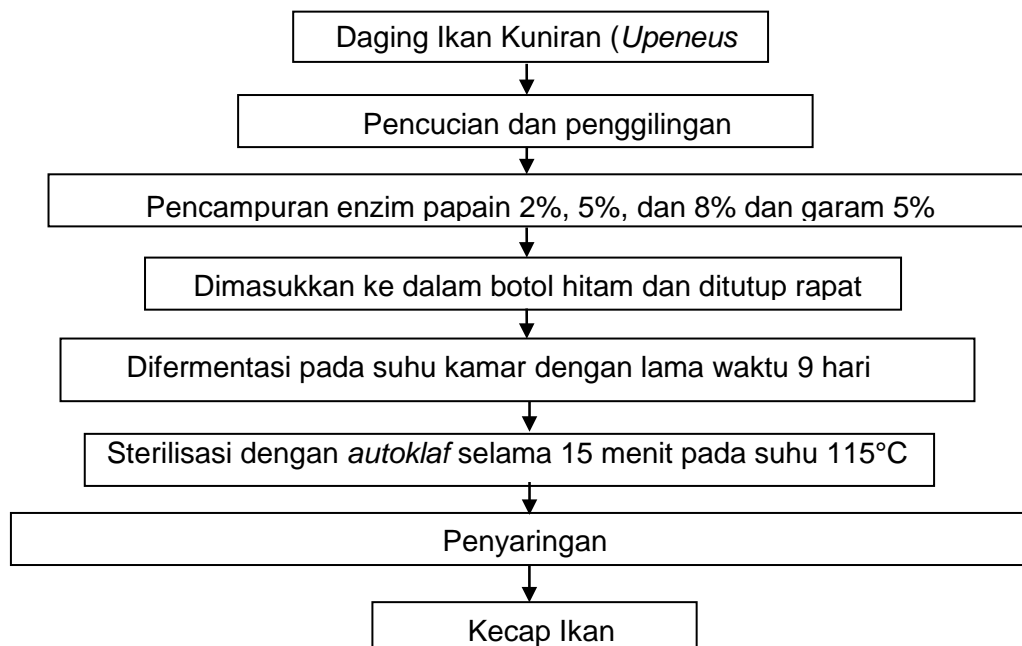
Tabel 7. Data Kadar Protein Kecap Ikan

Lama Fermentasi	Kadar Protein (%)
Kontrol	2.04±0.17
5 Hari	2.25±0.11
7 Hari	2.38±0.11
9 Hari	2.74±0.11

Sumber : Data Diolah (2017)

3.3.2 Penelitian Pendahuluan Tahap 2

Pada penelitian pendahuluan tahap dua bertujuan untuk memperoleh konsentrasi enzim papain yang terbaik dengan menggunakan kadar protein terlarut sebagai parameternya. Lama fermentasi yang digunakan merupakan hasil dari penelitian pendahuluan tahap satu. Menurut penelitian Simanjorang *et al.*, (2012) bahwa penambahan enzim papain terbaik terdapat pada konsentrasi enzim papain 5% dengan nilai kadar protein terlarut sebesar 2.698%. Oleh karena itu, konsentrasi tersebut dijadikan acuan untuk penelitian pendahuluan tahap dua dengan *range* konsentrasi enzim papain sebesar 2%, 5% dan 8%. Alur proses penelitian pendahuluan tahap dua dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 2. Alur Proses Penelitian Pendahuluan Tahap 2

Pada penelitian pendahuluan tahap dua ini didapat konsentrasi enzim papain terbaik terdapat pada konsentrasi 8% dengan nilai kadar protein terlarut sebesar 4.01 ± 0.12 sedangkan kadar protein terlarut terendah terdapat pada konsentrasi enzim papain sebesar 2% dengan nilai kadar protein sebesar 3.22 ± 0.07 . Dalam penelitian pendahuluan tahap dua ini didapat bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim papain maka semakin tinggi pula nilai kadar protein terlarut yang didapatkan. Menurut Kirk dan Orthmer (1953) peningkatan kandungan protein dalam produk hidrolisat disebabkan selama proses hidrolisis terjadi konversi protein yang bersifat tidak larut menjadi senyawa nitrogen yang bersifat larut, selanjutnya terurai menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana, seperti peptida dan asam amino sehingga mudah diserap oleh tubuh. Adapun kadar protein pada penelitian pendahuluan tahap tiga dapat dilihat pada Tabel 8. Dan hasil analisis statistik penelitian pendahuluan ini dapat dilihat pada Lampiran 2.

Tabel 8. Kadar Protein Penelitian Pendahuluan Tahap 2

Konsentrasi Enzim	Kadar Protein (%)
Kontrol	2.72 ± 0.24
2%	3.22 ± 0.07
5%	3.67 ± 0.10
8%	4.01 ± 0.12

Sumber : Data Diolah (2017)

3.4 Penelitian Utama

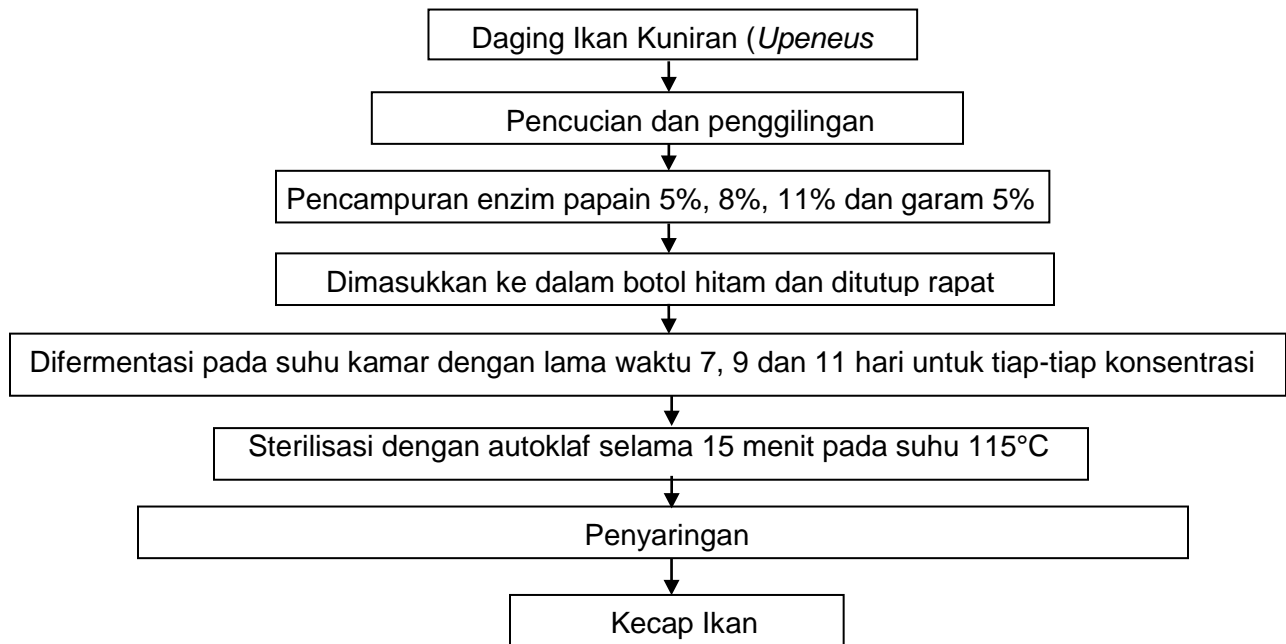
Penelitian utama bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim papain dan lama waktu fermentasi terhadap kualitas kecap ikan kuniran serta memperoleh konsentrasi enzim papain dan lama fermentasi yang optimum untuk mendapatkan kualitas kecap ikan terbaik. Konsentrasi enzim papain yang digunakan berdasarkan konsentrasi enzim papain terbaik pada penelitian pendahuluan tahap

dua dengan *range* 5%, 8% dan 11%. Sedangkan lama fermentasi yang digunakan berdasar lama fermentasi terbaik dari penelitian pendahuluan tahap satu dengan *range* 7 Hari, 9 Hari, dan 11 Hari.

3.4.1 Prosedur Penelitian Utama

Prosedur penelitian utama antara lain persiapan bahan baku yaitu ikan kuniran segar dengan berat 5 kg di bersihkan dan di buang isi perut lalu dihaluskan dengan blender. Ikan kuniran yang telah halus lalu mulai di beri berlakuan dengan masing – masing penambahan enzim papain sebesar 5%, 8%, dan 11% dan diberi tambahan garam sebesar 5%. Setelah itu dimasukkan ke dalam botol kaca hitam. Masing masing dari perlakuan enzim tersebut lalu di fermentasi dengan lama waktu masing – masing 7 Hari, 9 Hari dan 11 Hari. Setelah di dapat lama waktu yang sesuai, hasil dari fermentasi tersebut lalu di *autoklaf* selama 15 menit dengan suhu 115°C. Setelah itu di *centrifuge* dengan kecepatan 5000 rpm sehingga terpisah antara padatan dan larutan. Kecap Ikan dianalisa kadar protein, kadar abu, kadar air, kadar lemak, rendemen, derajat keasaman, profil asam amino dan uji organoleptik (hedonik aroma dan warna).

3.4.2 Metode Pembuatan Kecap Ikan



Gambar 3. Alur Proses Pembuatan Kecap Ikan Secara Enzimatis

3.5 Analisa Data

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor yaitu konsentrasi enzim (A) dan lama fermentasi (B). Suatu percobaan faktorial bila perlakuannya terdiri dari kombinasi lengkap antar level (antar taraf) dari dua faktor atau lebih dan masing-masing faktor terdiri dari dua taraf atau lebih. Pada faktor penambahan konsentrasi enzim papain (A) terdapat 3 taraf yaitu konsentrasi enzim papain 5% (A1), 8% (A2), dan 11% (A3) dan pada faktor lama waktu fermentasi (B) terdapat 3 taraf yaitu 7 hari (B1), 9 (B2) dan 11 (B3) hari.

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap atau RAL faktorial. Rancangan ini digunakan dalam penelitian dengan medium yang seragam. Data kemudian diolah menggunakan ANNOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf 5% dan 1%. Jika ditemukan perbedaan yang nyata maka akan dilanjutkan dengan uji

Tukey.

Adapun interaksi antara dua faktor dilakukan dengan 3 kali ulangan. Hal tersebut sesuai dengan persamaan:

$$(n-1)(r-1) \geq 15$$

Dimana :

n = perlakuan

r = ulangan

Sehingga banyaknya ulangan dapat dihitung sebagai berikut :

$$((3.3) - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(9 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$8r - 8 \geq 15$$

$$8r \geq 20$$

$$r \geq 2,875 \text{ (3 kali ulangan)}$$

Metode pengujian data yang digunakan adalah analisa keragaman (ANOVA) dimana jika terdapat pengaruh nyata atau sangat nyata maka akan dilanjutkan uji Tukey dengan aplikasi *Software* SPSS 16. Model statistika yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor A taraf ke-i, faktor B taraf ke-j, pada ulangan ke -k

μ = Rataan umum

A_i = Pengaruh faktor A pada taraf ke-i

B_j = Pengaruh faktor B pada taraf ke-j

$(AB)_{ij}$ = Interaksi antara A dan B pada faktor A taraf ke-i, faktor B taraf ke-j

ϵ_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor A taraf ke-l, faktor ke B taraf ke-j

pada ulangan ke-k

Model rancangan percobaan pada Penelitian Utama dapat dilihat pada tabel 8 dibawah ini :

Tabel 9. Rancangan Percobaan Penelitian

Perlakuan		Perlakuan Kombinasi	Ulangan			Rata – Rata
A	B		1	2	3	
A1	B1	A1B1	A1B1.1	A1B1.2	A1B1.3	
	B2	A1B2	A1B2.1	A1B2.2	A1B2.3	
	B3	A1B3	A1B3.1	A1B3.2	A1B3.3	
A2	B1	A2B1	A2B1.1	A2B1.2	A2B1.3	
	B2	A2B2	A2B2.1	A2B2.2	A2B2.3	
	B3	A2B3	A2.B3.1	A2B3.2	A2B3.3	
A3	B1	A3B1	A3B1.1	A3B1.3	A3B1.3	
	B2	A3B2	A3B2.1	A3B2.3	A3B2.3	
	B3	A3B3	A3B3.1	A3B3.3	A3B3.3	

Keterangan :

A1B1 : Konsentrasi enzim papain 5% dengan lama fermentasi 7 hari

A1B2 : Konsentrasi enzim papain 5% dengan lama fermentasi 9 hari

A1B3 : Konsentrasi enzim papain 5% dengan lama fermentasi 11 hari

A2B1 : Konsentrasi enzim papain 8% dengan lama fermentasi 7 hari

A2B2 : Konsentrasi enzim papain 8% dengan lama fermentasi 9 hari

A2B3 : Konsentrasi enzim papain 8% dengan lama fermentasi 11 hari

A3B1 : Konsentrasi enzim papain 11% dengan lama fermentasi 7 hari

A3B2 : Konsentrasi enzim papain 11% dengan lama fermentasi 9 hari

A3B3 : Konsentrasi enzim papain 11% dengan lama fermentasi 11 hari

3.6 Parameter Uji Kecap Ikan

3.6.1 Analisis Rendemen

Analisis rendemen yaitu perbandingan antara berat produk setelah jadi dengan berat adonan. Rendemen dapat dihitung dengan menimbang berat sampel campuran semua bahan sebelum pengolahan menggunakan neraca analitik. Ditimbang berat akhir yang dihasilkan setelah proses pemasakan dengan neraca analitik (AOAC, 1990). Prosentase rendemen yan dihasilkan dihitung menggunakan rumus :

$$Rendemen (\%) \text{ massa produk} = \frac{\text{massa produk kecap}}{\text{massa bahan baku}} \times 100\%$$

3.6.2 Analisis Kadar Protein terlarut

Analisis kadar protein terlarut secara cepat dan mudah dapat dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotomer dan reagen pereaksi biuret. Spektrofotometer adalah suatu alat yang dapat digunakan untuk mengukur absorbansi suatu sampel. Spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya (Khotimah *et al.*, 2013). Namun sampel yang dapat dianalisa oleh alat ini adalah sampel yang hanya memiliki warna. Sampel yang tidak memiliki warna harus dibuat berwarna terlebih dahulu dengan reagen spesifik yang mampu menghasilkan senyawa berwarna. Ditambahkan oleh Machin (2012) bahwa reagen biuret mengandung CuSO_4 . Biuret dibentuk dengan pemanasan urea dan mempunyai struktur mirip dengan struktur peptida dari protein. Prinsip reaksi biuret adalah reaksi antara tembaga sulfat dalam alkali dengan senyawa yang berisi dua atau lebih ikatan peptida seperti protein yang memberikan warna ungu biru yang khas. Fungsi reagen biuret untuk membentuk senyawa kompleks sehingga yang langsung dapat diidentifikasi. Reaksi biuret ini bersifat spesifik, artinya hanya senyawa yang mengandung ikatan peptida saja yang akan bereaksi dengan pereaksi biuret.

Pada analisis protein terlarut dilakukan dengan metode biuret yang telah mengalami modifikasi. Untuk kurva standar, larutan protein standar (larutan serum albumin dengan konsentrasi 5 mg/ml) dimasukkan dalam tabung reaksi masing – masing 0 (blanko), 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1 ml. Kemudian ditambahkan aquades

hingga volume total 4ml dan 6 ml pereaksi biuret ke dalam masing – masing tabung reaksi dan di homogenkan. Lalu tabung reaksi disimpan pada suhu 37°C selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu sempurna dan pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian sampel kecap ikan diambil 3 ml. sampel tersebut kemudian diencerkan dengan aquades hingga diperoleh 25 ml larutan sampel. Sampel kemudian disaring menggunakan kertas saring halus didalam Erlenmeyer. Kemudian sampel di sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil 4 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 6 ml pereaksi biuret pada masing – masing tabung reaksi dan dihomogenkan. Setelah itu ukur absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm. Hasil absorbansi dimasukkan kedalam persamaan Bovin Serum Albumin (BSA) dan dihitung kadar proteinnya (Wijaya dan Yuniarta, 2015).

3.6.3 Analisis Kadar Air

Analisis kandungan air dapat dilakukan dengan beberapa cara. Hal ini tergantung pada sifat bahannya. Pada umumnya penentuan kadar air dilakukan dengan mengeringkan bahan dalam oven pada suhu 105 – 110°C selama 3 jam atau sampai didapat berat yang konstan. Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan adalah banyaknya air yang diuapkan. Untuk bahan – bahan yang tidak tahan panas, seperti bahan berkadar gula tinggi, minyak, daging, kecap dan lain – lain pemanasan dilakukan dengan oven vakum dengan suhu yang lebih rendah. Kadang – kadang pengeringan dilakukan dengan H₂SO₄ pekat sebagai pengering sehingga mencapai berat yang konstan (Winarno, 2004).

Analisis kadar air dapat dilakukan dengan cara cawan porselen yang akan digunakan dikeringkan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 105-110°C selama 15 menit atau sampai berat konstan, kemudian cawan diletakkan ke dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang hingga didapatkan berat yang konstan (A). Sampel sebanyak 20 ml ditimbang dan diletakkan ke dalam cawan yang sudah dikeringkan (B), kemudian dipanaskan ke dalam oven vakum pada suhu 60-70°C selama 50 hingga 60 menit. Setelah selesai, cawan tersebut didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan setelah dingin ditimbang kembali (C). Tahap ini diulangi hingga dicapai bobot yang konstan (AOAC, 1990). Kadar air dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{B - C}{B - A} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = Berat cawan kosong (gram)

B = Berat cawan dengan sampel sebelum dikeringkan (gram)

C = Berat cawan dengan sampel setelah dikeringkan (gram)

3.6.4 Analisis Kadar Abu

Analisis kadar abu adalah mengoksidasikan senyawa organik pada suhu yang tinggi yaitu sekitar 500-600°C dan melakukan penimbangan zat yang tersisa setelah proses pembakaran tersebut. Waktu lamanya pengabuan tiap bahan berbeda-beda dan berkisar antara 2-8 jam. Pengabuan dilakukan pada alat pengabuan yaitu tanur yang dapat diatur suhunya. Pengabuan dianggap selesai apabila diperoleh sisa pembakaran yang umumnya berwarna putih abu-abu dan beratnya konstan dengan selang waktu 30 menit. Penimbangan terhadap bahan dilakukan dalam keadaan dingin, untuk itu cawan berisi abu yang ada dalam tanur harus lebih dahulu dimasukan

ke dalam oven bersuhu 105°C agar suhunya turun menyesuaikan dengan suhu didalam oven, barulah dimasukkan ke dalam desikator sampai dingin, barulah abunya dapat ditimbang hingga hasil timbangannya konstan (Sudarmadji, 2007).

Analisis kadar abu dapat dilakukan dengan cawan yang akan digunakan dikeringkan di dalam oven terlebih dahulu selama 30 menit pada suhu 100-105°C, kemudian didinginkan ke dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang hingga didapatkan berat yang konstan (A). Sampel basah ditimbang sebanyak 20 gram atau ml dan diletakkan ke dalam cawan yang sudah dikeringkan, kemudian dipanaskan ke dalam oven vakum pada suhu 60-70°C selama 50 hingga 60 menit hingga berat konstan (B) kemudian sampel yang sudah kering dibakar menggunakan *hotplate* sampai tidak berasap selama ± 20 menit. Dilanjutkan dengan pengaburan didalam tanur dengan suhu 600°C sampai pengaburan sempurna (sesekali pintu tanur dibuka sedikit agar oksigen masuk). Sampel yang sudah diabukan didinginkan ke dalam desikator dan ditimbang. Tahap pembakaran dalam tanur diulangi hingga didapatkan berat yang konstan (C) (AOAC, 1990). Kadar abu dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{C-A}{B-A} \times 100 \%$$

Keterangan:

A = Berat cawan abu porselen kosong (gram)

B = Berat cawan abu porselen dengan sampel sebelum pengaburan (gram)

C = Berat cawan abu porselen dengan sampel setelah pengaburan (gram)

3.6.5 Analisis Kadar Lemak

Pada analisis kadar lemak kecap ikan total dilakukan dengan metode goldfish yang telah di modifikasi menurut Sudarmadji *et al.*, (2007), dapat dilakukan

dengan cara bahan ditimbang sebanyak 20 ml. Sampel basah ditimbang sebanyak 20 gram atau ml kemudian diletakkan ke dalam cawan yang kemudian dipanaskan ke dalam oven vakum pada suhu 60-70°C selama 50 hingga 60 menit hingga berat konstan dan menghasilkan residu berupa padatan. Residu yang berupa padatan kemudian ditimbang sebanyak 2 gram. Kemudian dimasukkan dalam kertas saring dan dimasukkan dalam timbel, yaitu pembungkus bahan yang terbuat alumina yang porous. Dipasang bahan dan timbel pada sample tube, yaitu gelas penyangga yang bagian wadahnya terbuka, tepat dibawah kondensor alat distilasi Goldfisch. Dimasukkan petroleum-ether (maksimal 75 mililiter) dalam gelas piala khusus yang diketahui beratnya. Dilakukan ekstraksi selama 3-4 jam. Ekstrak lemak dikeringkan dalam oven dan ditimbang berat minyak dalam bahan. Kadar lemak dapat dihitung dengan rumus berikut :

$$\% \text{ Kadar lemak} = \frac{(\text{berat awal sampel} + \text{berat kertas saring}) - \text{berat akhir}}{\text{berat awal sampel}} \times 100\%$$

3.6.6 Analisis Uji Organoleptik

Pengamatan organoleptik dari kecap ikan dengan dilakukan uji sensori hedonik meliputi aroma dan warna. Jumlah panelis yang berpartisipasi adalah 15 panelis semi terlatih. Mereka dipilih berdasarkan keterkarikannya terhadap kecap ikan. Pengujian menggunakan uji skala hedonik yang terdiri dari 7 nilai dengan 7 pernyataan yaitu sangat tidak suka (1), tidak suka (2), agak tidak suka (3), netral/ biasa (4), agak suka (5), suka (6), dan sangat suka (7). Pengujian dilakukan dengan menyodorkan secara acak 10 sampel (9 sampel hasil penelitian dengan perlakuan yang berbeda-beda, dan 1 sampel kontrol) yang masing-masing telah diberi kode yang berbeda-beda. Selanjutnya panelis diminta memberi penilaian terhadap sampel sesuai dengan skala yang ada..

3.6.7 Analisis Uji Derajat Keasaman (pH)

Lakukan kalibrasi alat pH-meter dengan larutan penyangga sesuai instruksi kerja alat setiap kali akan melakukan pengukuran. Untuk contoh uji yang mempunyai suhu tinggi, kondisikan contoh uji sampai suhu kamar. Keringkan dengan kertas tisu selanjutnya bilas elektroda dengan air suling. Bilas elektroda dengan contoh uji. Celupkan elektroda ke dalam contoh uji sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap. Catat hasil pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter (AOAC ,1990).

3.6.8 Analisis Profil Asam Amino

Analisis asam amino ditentukan dengan menggunakan HPLC merk Shimadzu RF 20A. Analisis asam amino menggunakan HPLC terdiri dari empat tahap, yaitu tahap pembuatan hidrolisat protein, tahap pengeringan, tahap derivatisasi, dan tahap injeksi serta analisis asam amino (AOAC, 1990).

1) Tahap pembuatan hidrolisat protein

Hal yang dilakukan pada tahap pembuatan hidrolisat protein adalah sampel ditimbang sebanyak 3 mg dan dihancurkan. Sampel yang telah hancur dihidrolisis asam menggunakan HCl 6 N sebanyak 10 mL yang kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 110 °C selama 24 jam. Sebelum dilaukan pemanasan, ditambahkan gas N₂ pada sampel untuk menghilangkan gas atau udara yang ada pada sampel agar tidak mengganggu kromatogram yang dihasilkan. Pemanasan dilakukan untuk mempercepat reaksi hidrolisis.

2) Tahap pengeringan

Sampel disaring menggunakan kertas saring dan dikeringkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 85 °C selama 30 menit. Hal ini dilakukan untuk memisahkan pelarut dengan asam amino.

3) Tahap derivatisasi

Larutan derivatisasi dibuat dari campuran ortoftalaldehida (OPA) 50 mg, metanol 4 mL, merkaptotetanol 0,025 mL, brij-30 30% sebanyak 0,050 mL, dan buffer borat 1 M pH = 10,4. Pereaksi derivatisasi dibuat dengan mencampurkan satu bagian larutan stok dengan dua bagian larutan buffer Kalium Borat pH 10,4. Proses derivatisasi dilakukan agar detektor mudah untuk mendeteksi senyawa yang ada pada sampel. Sampel yang telah dikeringkan ditambahkan dengan 5 mL HCl 0,01 N kemudian disaring menggunakan kertas milipore.

4) Tahap injeksi ke HPLC

Injeksi larutan standar diawali dengan pencampuran larutan stok dengan larutan standar dan buffer borat (1:1). Sebanyak 5 µL larutan tersebut diinjeksi ke HPLC dalam waktu 30 menit. Tahapan yang sama dilakukan pada sampel yaitu dengan mencampurkannya dengan buffer borat (1:1) dan dilakukan pencampuran dengan larutan stok. Campuran diinjeksi ke HPLC sampai pendeteksian semua asam amino selesai. Kandungan asam amino pada bahan dihitung dengan rumus:

$$\text{asam amino (\%)} = \frac{\text{luas area sampel} \times C \times FP \times BM \times 100\%}{\text{luas area standar} \times \text{bobot sampel}}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi standar asam amino (µg/mL)

FP = Faktor pengenceran

BM = Bobot molekul dari masing-masing asam amino (g/mol)

Kondisi alat:

Fase diam/ Stationer = Ultra techspere (*Octadecyl-silica* (ODS) / C18)

Laju alir = 1 mL/menit

Detektor = Flame Ionization Detector (FID) Flouresensi

Mobile Phase = Buffer A (Na-asetat dan Na-EDTA)

Buffer B (metanol 95% dan air 65 : 35)